

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2005 年 2 月 24 日 (24.02.2005)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2005/017200 A1

(51) 国際特許分類<sup>7</sup>: C12Q 1/68, G01N 33/15 // C12N 15/12

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/012151

(22) 国際出願日: 2004 年 8 月 18 日 (18.08.2004)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2003-207698 2003 年 8 月 18 日 (18.08.2003) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人理化学研究所 (RIKEN) [JP/JP]; 〒3510198 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 Saitama (JP).

(71) 出願人 および

(72) 発明者: 田中 敏博 (TANAKA, Toshihiro) [JP/JP]; 〒1530062 東京都目黒区三田 1-5-6-801 Tokyo (JP). 大西洋三 (OHNISHI, Yozo) [JP/JP]; 〒1520023 東京都目黒区八雲 3-29-13-2 Tokyo (JP). 尾崎 浩一 (OZAKI, Kouichi) [JP/JP]; 〒1400002 東京都品川区東品川 4-12-9-504 Tokyo (JP). 飯田 有俊 (IIDA, Aritoshi) [JP/JP]; 〒2110014 神奈川県川崎市中原区田尻町 2-1 Kanagawa (JP). 堀 正二 (HORI, Masatsugu) [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田市山田丘 2-2 大阪大学大学院医学系研究科病態情報内科学内 Osaka (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 中村 祐輔 (NAKA-MURA, Yusuke) [JP/JP]; 〒2250011 神奈川県横浜市青葉区あざみ野 1-17-33 Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人特許事務所サイクス (SIKS & CO.); 〒1040031 東京都中央区京橋一丁目 8 番 7 号 京橋日殖ビル 8 階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF JUDGING INFLAMMATORY DISEASE BY USING SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM IN GALECTIN-2 GENE

(54) 発明の名称: galectin-2 遺伝子内一塩基多型を用いた炎症性疾患の判定方法

(57) Abstract: It is intended to identify a novel single nucleotide polymorphism (SNP) participating in the onset and progress of an inflammatory disease such as myocardial infarction. Namely, a method of judging an inflammatory disease which comprises detecting at least one gene polymorphism occurring in galectin-2 gene.

(57) 要約: 本発明の目的は、心筋梗塞等の炎症性疾患の発症進展に関与する新規な一塩基多型 (SNP) を同定することである。本発明によれば、galectin-2 遺伝子に存在する少なくとも一種の遺伝子多型を検出することを含む、炎症性疾患の判定方法が提供される。

WO 2005/017200 A1

## galectin-2 遺伝子内一塩基多型を用いた炎症性疾患の判定方法

## 技術分野

本発明は、galectin-2（ガレクチン-2）遺伝子に存在する遺伝子多型を検出することを含む炎症性疾患の診断方法、該方法に使用されるオリゴヌクレオチド、該オリゴヌクレオチドを含む炎症性疾患診断用キット、並びにそれらの利用に関する。

## 背景技術

ライフスタイルの変化及び新しい薬理学的アプローチにも関わらず、心筋梗塞を含む冠動脈疾患は多くの国々において主要な死亡原因となっている（Breslow, J. L., Nature Med. 3, 600-601, 1997; Braunwald, E., N. Engl. J. Med., 337, 1360-1369, 1997）。従って、それらの発症における遺伝的及び環境的因子を同定することが強く望まれている。

共通の遺伝的変異は、糖尿病や高血圧症などの生活習慣病に罹患する危険性と顕著に関連していることが知られている（Risch, N., et al., Science, 273, 1516-1517, 1996; Collins, F. S., et al., Science, 278, 1580-1581, 1997; Lander, E. S., et al., Science, 274, 536-539, 1996）。多遺伝子性疾患の感受性遺伝子を同定するには、「連鎖」を利用する方法と、「関連」を利用する方法がある。連鎖解析では、疾患感受性遺伝子の座位と遺伝マーカー（主としてマイクロサテライト）の座位が連鎖しているかを検出する、すなわち遺伝子座位間の関係を調べるのに対して、関連解析では特定の遺伝マーカー（主として一塩基多型：SNP）のどの型（アレル：対立遺伝子）が疾患と関連しているかを検出する、つまり対立遺伝子間の関係を調べる。従って、共通の変異をマーカーとして用いる関連解析は疾患関連遺伝子の局在に対する連鎖解析のよりもずっと強力といえる。一塩基多型（SNPs）は、疾患易罹患性や薬剤反応性に関連する遺伝子を探索する際の有用な多型マーカーとなる。SNPsは、遺伝子産物の質や量に直接影響を与えたり、ある疾患や薬剤による重篤な副作用に対する危険性を増やすことがある。よって、多くのSNPsを探索するこ

とにより、疾患関連遺伝子の同定や薬剤による副作用を避ける診断方法の確立に寄与できることを期待される。

遺伝子変異と心筋梗塞との関係については、これまでヒトプロスタサイクリン合成酵素遺伝子の多型を分析して心筋梗塞の遺伝的要因を判定する方法(特開2002-136291号公報)などがある。しかしながら、心筋梗塞と関連のある遺伝子変異の解明は未だ十分なものではない。

一方、現在までの所、哺乳類には10種類のガレクチンが知られている。そのうちの galectin-2 は galectin-1 に対して43%と高い相同性を示す。galectin-2 は galectin-1 と同様、14kDaのサブユニット2つからなる非共有結合性の二量体を形成し、還元剤非存在下では自己凝集し、活性を失う。また、galectin-2 は galectin-1 と比較して組織分布は狭い。galectin-1 の場合、筋肉等の間充組織をはじめ様々な細胞系列に豊富に存在するが、galectin-2 は正常成人組織の中では下部小腸を主とした上皮細胞に多く認められる。galectin-2 の詳細な機能についてはまだ解明されていない(Trends in Glycoscience and Glycotechnology Vol. 9, No. 45, (1997) pp. 87-93)。

#### 発明の開示

本発明は、心筋梗塞等の炎症性疾患の発症進展に関与する新規な一塩基多型(SNP)を同定することを解決すべき課題とした。さらに本発明は、同定したSNPを利用して、心筋梗塞等の炎症性疾患の診断法、又は炎症性疾患の治療薬の開発法を提供することを解決すべき課題とした。

本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討した結果、galectin-1 および galectin-2 遺伝子産物が心筋梗塞感受性遺伝子産物 lymphotoxin-alpha (LTA) に結合すること、並びに galectin-2 遺伝子内の新規一塩基多型(SNP)が心筋梗塞の発症進展に関連していることを同定することにより本発明を完成するに至った。

即ち、本発明によれば、galectin-2 遺伝子に存在する少なくとも一種の遺伝子多型を検出することを含む、炎症性疾患の判定方法が提供される。

好ましくは、galectin-2 遺伝子に存在する少なくとも一種の一塩基多型を検出することを含む、炎症性疾患の判定方法が提供される。

さらに好ましくは、配列番号 1 に示す galectin-2 遺伝子のイントロン 1 の塩基配列において 3 2 7 9 番目の塩基における C/T の多型を検出することを含む、炎症性疾患の判定方法が提供される。

好ましくは、炎症性疾患は心筋梗塞である。

本発明の別の側面によれば、配列番号 1 に示す galectin-2 遺伝子のイントロン 1 の塩基配列において 3 2 7 9 番目の塩基を含む連続する少なくとも 10 塩基の配列、又はその相補配列にハイブリダイズすることができ、請求項 1 から 4 の何れかに記載の方法においてプローブとして用いるオリゴヌクレオチドが提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、配列番号 1 に示す galectin-2 遺伝子のイントロン 1 の塩基配列において 3 2 7 9 番目の塩基を含む連続する少なくとも 10 塩基の配列、及び／又はその相補配列を増幅することができ、請求項 1 から 4 の何れかに記載の方法においてプライマーとして用いるオリゴヌクレオチドが提供される。

好ましくは、プライマーはフォワードプライマー及び／又はリバースプライマーである。

本発明のさらに別の側面によれば、上記のいずれかに記載のオリゴヌクレチドの 1 種以上を含む、炎症性疾患診断用キットが提供される。好ましくは、炎症性疾患は心筋梗塞である。

本発明のさらに別の側面によれば、配列番号 1 に示す galectin-2 遺伝子のイントロン 1 の塩基配列において 3 2 7 9 番目の塩基における C/T の多型を検出することを含む、galectin-2 の発現状態の分析方法が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、候補物質の存在下で細胞内の galectin-2 遺伝子又は galectin-1 遺伝子の発現量を分析し、その発現量を変化させる物質を選択する工程を含む、炎症性疾患の治療薬のスクリーニング方法が提供される。好ましくは、候補物質の存在下で細胞内の galectin-2 遺伝子又は galectin-1 遺伝子の発現量を分析し、その発現量を増大させる物質を選択する工程を含む、炎症性疾患

の治療薬のスクリーニング方法が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、候補物質の存在下でリンホトキシン- $\alpha$  (LTA) と galectin-2 遺伝子産物又は galectin-1 遺伝子産物との結合を測定し、該結合を阻害する物質を選択する工程を含む、炎症性疾患の治療薬のスクリーニング方法が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、配列番号 1 に示す galectin-2 遺伝子のイントロン 1 の塩基配列において 3 2 7 9 番目の塩基における C/T の多型を含む galectin-2 遺伝子断片を細胞に導入し、該細胞を培養し、該遺伝子の発現を分析することを含む、galectin-2 の転写活性の測定方法が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、配列番号 1 に示す galectin-2 遺伝子のイントロン 1 の塩基配列において 3 2 7 9 番目の塩基における C/T の多型を含む galectin-2 遺伝子断片を細胞に導入し、galectin-2 の転写活性を阻害又は促進する候補物質の存在下で該細胞を培養し、該遺伝子の発現を分析することを含む、galectin-2 の転写活性を阻害又は促進する物質のスクリーニング方法が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、上記のスクリーニング方法により得られる galectin-2 の転写活性を阻害又は促進する物質が提供される。

本発明の方法で好ましくは、前記 galectin-2 遺伝子断片の下流にリポーター遺伝子を結合させた転写ユニットを細胞に導入し、該細胞を培養し、リポーター活性を測定することによって該遺伝子の発現を分析する。さらに好ましくは、前記リポーター遺伝子はルシフェラーゼ遺伝子である。

本発明のさらに別の側面によれば、配列番号 1 に示す galectin-2 遺伝子のイントロン 1 の塩基配列において 3 2 7 9 番目の塩基における C/T の多型を含む galectin-2 遺伝子断片と galectin-2 の転写制御因子の存在が予想される試料とを接触させ、上記断片と転写制御因子との結合を検出することを含む、galectin-2 の転写制御因子のスクリーニング方法が提供される。好ましくは、検出はゲルシフトアッセイにより行われる。

## 図面の簡単な説明

図1は、LTAと galectin-1 及び-2 とのインビトロでの結合を確認した実験の結果を示す。

図2は、galectin-2 遺伝子のイントロン1の3279C>TのSNPが転写活性に与える影響を調べた結果を示す。

図3は、galectin-2 と微小管との相互作用を調べた結果を示す。aはTAPのタグの galectin-2 と相互作用タンパク質の単離を示す。bは、内因性 $\alpha$ -チューブリンとFlagのタグのついた galectin-2 又はLTA との共免疫沈降の実験結果を示す。cは、U937 細胞における内因性 $\alpha$ -チューブリンと内因性 galectin-2 又はLTA との共局在の実験結果を示す。

図4は、冠状動脈粥腫切除切片における galectin-2 と LTA の発現及び共局在を調べた結果を示す。aは抗ヒトLTAで染色、bは抗ヒト galectin-2 で染色、cはモノクローナル抗SMC $\alpha$ -アクチンで染色、dはモノクローナル抗CD68で染色した。eは、抗LTA抗体及び抗 galectin-2 抗体で二重染色した。fは、抗ヒトLTAで染色した。

## 発明を実施するための最良の形態

本発明では、galectin-1 および galectin-2 遺伝子産物が心筋梗塞等の炎症性疾患感受性遺伝子産物として知られている lymphotoxin- $\alpha$  (LTA) (Ozaki K et al. Nature Genetics 32, 650-654, 2002) 産物と結合することを同定した。さらに、galectin-2 遺伝子内の新規一塩基多型 (SNP) を同定し、それぞれ約2000人の心筋梗塞患者群とコントロール群についてPCR-DNAシーケンス法によりタイピングし、相関解析 (カイ二乗検定など) を行った結果、この新規SNPの頻度が統計学的に有意に心筋梗塞患者で少ないことを見出した。さらにルシフェラーゼアッセイ法を用いた実験により、この新規SNPが実際に生物学的機能を有し、この galectin-2 遺伝子産物量の変化が心筋梗塞に限らず様々な炎症性疾患を引き起こすことを明らかにした。

上記の通り、本発明では、LTAタンパク質に結合する新たな分子として

galectin-1 および galectin-2 タンパク質を同定した。さらに galectin-2 遺伝子内の新規 SNP が生物学的な機能を有し、心筋梗塞等の疾患に関連することを同定した。従って、本発明により同定された galectin-2 遺伝子の新規 SNP を利用することにより、心筋梗塞等の炎症性疾患の新たな診断、予防法、治療薬の開発が可能になる。以下、本発明の実施の形態についてさらに具体的に説明する。

#### [1] 炎症性疾患の判定方法

本発明の方法は、炎症性疾患と関連性を示す galectin-2 遺伝子に存在する遺伝子多型、特には一塩基多型 (SNPs) を検出することによって、炎症性疾患の発症の有無、あるいは炎症性疾患の発症の可能性を判定する方法である。

本発明において「galectin-2 遺伝子に存在する少なくとも一種の遺伝子多型 (一塩基多型など) を検出する」とは、(i) 当該遺伝子多型 (遺伝子側多型と称する) を直接検出すること、及び (i i) 前記遺伝子の相補配列側に存在する遺伝子多型 (相補側多型と称する) を検出し、その検出結果から遺伝子側多型を推定することの双方を指すものとする。ただし、遺伝子側の塩基と相補配列側の塩基とが完全に相補的な関係にあるとは限らないという理由から、遺伝子側多型を直接検出することがより好ましい。

galectin-2 遺伝子に存在する遺伝子多型の好ましい具体例としては、配列番号 1 に示す galectin-2 遺伝子のイントロン 1 の塩基配列において 3 2 7 9 番目の塩基における C/T の多型を挙げることができる。

本明細書において、配列番号 1 に示す galectin-2 遺伝子のイントロン 1 の塩基配列において 3 2 7 9 番目の塩基は、配列番号 2 に示す galectin-2 遺伝子のゲノム配列の 3 4 4 9 番目の塩基に相当する。

例えば、後記表 1 に示すように、配列番号 1 に示す galectin-2 遺伝子のイントロン 1 の塩基配列の 3 2 7 9 番目の塩基が C である場合 (galectin-2 イントロン 1 3 2 7 9 C) は、炎症性疾患が発症している、あるいは発症の可能性が高いと判定できる。

これに対し、配列番号 1 に示す galectin-2 遺伝子のイントロン 1 の塩基配列の 3 2 7 9 番目の塩基が T である場合 (galectin-2 イントロン 1 3 2 7 9 T) は、

炎症性疾患が発症していない、あるいは発症の可能性が低いと判定できる。

本明細書において、疾患の「判定」とは疾患発症の有無の判断、疾患発症の可能性の判断（罹患危険性の予想）、疾患の遺伝的要因の解明などをいう。

また、疾患の「判定」は、上記の一塩基多型の検出法による結果と、所望により他の多型分析（VNTRやRFLP）及び／又は他の検査結果と合わせて行うこともできる。

また、本明細書において、「炎症性疾患」とは、炎症性病態との相関が知られている細胞接着因子やサイトカインの誘導が認められる疾患であれば特に限定はされないが、例えば慢性関節リウマチ、全身性エリマトーデス、炎症性腸炎、種々のアレルギー反応、細菌性ショック、心筋梗塞や脳卒中などの動脈硬化性疾患などが挙げられ、特に心筋梗塞が挙げられる。

#### （検出対象）

遺伝子多型の検出の対象は、ゲノムDNAが好ましいが、場合によっては（つまり多型部位及びその隣接領域の配列がゲノムと同一または完全相補的になっている場合）cDNA、又はmRNAを使用することもできる。また、上記対象を採取する試料としては、任意の生物学的試料、例えば血液、骨髄液、精液、腹腔液、尿等の体液；肝臓等の組織細胞；毛髪等の体毛等が挙げられる。ゲノムDNA等は、これらの試料より常法に従い抽出、精製し、調製することができる。

#### （増幅）

遺伝子多型を検出するにあたっては、まず遺伝子多型を含む部分を増幅する。増幅は、例えばPCR法によって行われるが、他の公知の増幅方法、例えばNASBA法、LCR法、SDA法、LAMP法等で行ってもよい。

プライマーの選択は、例えば、配列番号1（又は配列番号3）に示される配列における、前記の一塩基多型部位を含む連続する少なくとも10塩基以上、好ましくは10～100塩基、より好ましくは10～50塩基の配列、及び／又はその相補配列を増幅するように行う。

プライマーは、前記の一塩基多型部位を含む所定塩基数の配列を増幅するためのプライマーとして機能し得る限り、その配列において1又はそれ以上の置換、欠失、



付加を含んでもよい。

増幅のために用いるプライマーは、試料が一の対立遺伝子型の場合にのみ増幅されるようにフォワードプライマー又はリバースプライマーの一方が一塩基多型部位にハイブリダイズするように選択してもよい。プライマーは必要に応じて蛍光物質や放射性物質等により標識することができる。

#### (遺伝子多型の検出)

遺伝子多型の検出は、一の対立遺伝子型に特異的なプローブとのハイブリダイゼーションにより行うことができる。プローブは、必要に応じて、蛍光物質や放射性物質等の適当な手段により標識してもよい。プローブは、前記の一塩基多型部位を含み、被検試料とハイブリダイズし、採用する検出条件下に検出可能な程度の特異性を与えるものである限り何等限定はない。プローブとしては、例えば配列番号 1

(又は配列番号 3) に示す配列における前記の一塩基多型部位を含む連続する少なくとも 10 塩基以上、好ましくは 10～100 塩基の配列、より好ましくは 10～50 塩基の配列、又はそれらの相補配列にハイブリダイズすることのできるオリゴヌクレオチドを用いることができる。また、一塩基多型部位がプローブのほぼ中心部に存在するようにオリゴヌクレオチドを選択するのが好ましい。該オリゴヌクレオチドは、プローブとして機能し得る限り、即ち、目的の対立遺伝子型の配列とハイブリダイズするが、他の対立遺伝子型の配列とはハイブリダイズしない条件下でハイブリダイズする限り、その配列において 1 又はそれ以上の置換、欠失、付加を含んでもよい。また、プローブには、RCA (rolling circle amplification) 法による増幅に用いられる一本鎖プローブ (パドロックプローブ) のように、ゲノム DNA とアニールし、環状になることによって上記のプローブの条件を満たすプローブが含まれる。

本発明に用いるハイブリダイゼーション条件は、対立遺伝子型を区別するのに十分な条件である。例えば、試料が一の対立遺伝子型の場合にはハイブリダイズするが、他の対立遺伝子型の場合にはハイブリダイズしないような条件、例えばストリンジントな条件である。ここで、「ストリンジントな条件」としては、例えば、例えば、モレキュラークロニング・ア・ラボラトリーマニュアル第 2 版 (Sam

brook et al., 1989) に記載の条件等が挙げられる。具体的には、例えば、 $6\times\text{SSC}$  ( $1\times\text{SSC}$ の組成： $0.15\text{M NaCl}$ 、 $0.015\text{M}$ クエン酸ナトリウム、 $\text{pH}7.0$ )、 $0.5\%\text{SDS}$ 、 $5\times$ デンハート及び $100\text{mg/ml}$ ニシン精子DNAを含む溶液中プローブとともに $65^\circ\text{C}$ で一晩保温するという条件等が挙げられる。

プローブは、一端を基板に固定してDNAチップとして用いることもできる。この場合、DNAチップには、一の対立遺伝子型に対応するプローブのみが固定されていても、両方の対立遺伝子型に対応するプローブが固定されていてもよい。

遺伝子多型の検出は、制限酵素断片長多型分析法 (RFLP: Restriction fragment length polymorphism) により行うこともできる。この方法では、一塩基多型部位がいずれの遺伝子型をとるかによって制限酵素により切断されるか否かが異なってくる制限酵素で試料核酸を消化し、消化物の断片の大きさを調べることにより、該制限酵素で試料核酸が切断されたか否かを調べ、それによって試料の多型を分析する。

遺伝子多型の検出は、増幅産物を直接配列決定することによって行ってもよい (ダイレクトシーケンシング法)。配列決定は、例えばジデオキシ法、Maxam-Gilbert法等の公知の方法により行うことができる。

遺伝子多型の検出はまた、変性勾配ゲル電気泳動法 (DGGE: denaturing gradient gel electrophoresis)、一本鎖コンフォメーション多型解析 (SSCP: single strand conformation polymorphism)、対立遺伝子特異的PCR (allele-specific PCR)、ASO (allele-specific oligonucleotide) によるハイブリダイゼーション法、ミスマッチ部位の化学的切断 (CCM: chemical cleavage of mismatches)、HET (heteroduplex method) 法、PEX (primer extension) 法、RCA (rolling circle amplification) 法等を用いることができる。

## [2] 炎症性疾患診断用キット

前記のプライマー又はプローブとしてのオリゴヌクレオチドは、これを含む炎症疾患診断用キットとして提供できる、キットは、上記遺伝子多型の分析法に使用される制限酵素、ポリメラーゼ、ヌクレオシド三リン酸、標識、緩衝液等を含んでい

てもよい。

### [3] galectin-2 の発現状態の分析方法

本発明によればまた、前記した一塩基多型を検出することによって、galectin-2 の発現状態を分析することができる。

例えば、配列番号 1 に示す galectin-2 遺伝子のイントロン 1 の塩基配列の 3 2 7 9 番目の塩基が C である場合 (galectin-2 イントロン 1 3 2 7 9 C) は、galectin-2 の発現量が低いと判断できる。これに対し、配列番号 1 に示す galectin-2 遺伝子のイントロン 1 の塩基配列の 3 2 7 9 番目の塩基が T である場合 (galectin-2 イントロン 1 3 2 7 9 T) である場合は、galectin-2 の発現量が高いと判断できる。

### [4] 炎症性疾患の治療薬のスクリーニング方法

本発明によれば、候補物質の存在下で細胞内の galectin-2 遺伝子又は galectin-1 遺伝子の発現量を分析し、その発現量を変化させる物質を選択することによって、炎症性疾患の治療薬をスクリーニングすることができる。例えば、候補物質の存在下で細胞内の galectin-2 遺伝子又は galectin-1 遺伝子の発現量を分析し、その発現量を増大又は減少させる物質を選択することができ、特に好ましくはその発現量を増大させる物質を選択することができる。さらに本発明によれば、候補物質の存在下でリンホトキシン- $\alpha$  (LTA) と galectin-2 遺伝子産物又は galectin-1 遺伝子産物との結合を測定し、該結合を阻害する物質を選択することによって、炎症性疾患の治療薬をスクリーニングすることができる。

上記スクリーニングの一例としては、細胞と候補物質とを接触させる工程、細胞内における galectin-2 遺伝子又は galectin-1 遺伝子の発現量を分析する工程、及び候補物質の非存在下の条件と比較して当該遺伝子の発現量を変化させる候補物質を炎症性疾患の治療薬として選択する工程により行うことができる。

候補物質としては任意の物質を使用することができる。候補物質の種類は特に限定されず、個々の低分子合成化合物でもよいし、天然物抽出物中に存在する化合物でもよく、あるいは化合物ライブラリー、ファージディスプレイライブラリー、コンビナトリアルライブラリーでもよい。候補物質は、好ましくは低分子化合物であ

り、低分子化合物の化合物ライブラリーが好ましい。化合物ライブラリーの構築は当業者に公知であり、また市販の化合物ライブラリーを使用することもできる。

#### [5] galectin-2 の転写活性の測定方法

本発明によればまた、前記した一塩基多型を含む galectin-2 遺伝子断片を細胞に導入し、該細胞を培養し、該遺伝子の発現を分析することによって galectin-2 の転写活性を測定することができる。

本発明の好ましい態様によれば、前記 galectin-2 遺伝子断片の下流にリポーター遺伝子を結合させた転写ユニットを細胞に導入し、該細胞を培養し、リポーター活性を測定することによって該遺伝子の発現を分析する。

例えば、一塩基多型がプロモーター部位に存在する場合は、その一塩基多型を含む遺伝子の下流にレポーター遺伝子を挿入した系を導入した細胞を培養し、レポーター活性を測定すれば、一塩基多型による転写効率に違いを測定することができる。

ここでリポーター遺伝子としては、ルシフェラーゼ、クロラムフェニコール、アセチルトランスフェラーゼ、ガラクトシダーゼなどの遺伝子が用いられる。

#### [6] galectin-2 の転写活性を阻害又は促進する物質のスクリーニング方法

本発明においては、前記した一塩基多型を含む galectin-2 遺伝子断片を細胞に導入し、galectin-2 の転写活性を阻害又は促進する候補物質の存在下で該細胞を培養し、該遺伝子の発現を分析することによって galectin-2 転写活性を阻害又は促進する物質をスクリーニングすることができる。

本発明の好ましい態様によれば、前記 galectin-2 遺伝子断片の下流にリポーター遺伝子を結合させた転写ユニットを細胞に導入し、該細胞を培養し、リポーター活性を測定することによって該遺伝子の発現を分析する。

例えば、galectin-2の発現量が有意に高いことが認められる一塩基多型（例えば、galectin-2 イントロン1 3279T）を有する遺伝子の下流にレポーター遺伝子を挿入した系を導入した細胞を候補物質の存在下又は非存在下の両方の場合について培養し、候補物質の存在下で培養を行った場合にレポーター活性が下がれば、その候補物質はgalectin-2転写活性阻害物質として選択することができる。

ここでリポーター遺伝子としては、上記に挙げた遺伝子が用いられる。

候補物質としては任意の物質を使用することができる。候補物質の種類は特に限定されず、個々の低分子合成化合物でもよいし、天然物抽出物中に存在する化合物でもよく、あるいは化合物ライブラリー、ファージディスプレイライブラリー、コンビナトリアルライブラリーでもよい。候補物質は、好ましくは低分子化合物であり、低分子化合物の化合物ライブラリーが好ましい。化合物ライブラリーの構築は当業者に公知であり、また市販の化合物ライブラリーを使用することもできる。

上記のスクリーニング法により得られるgalectin-2の転写活性を阻害又は促進する物質もまた本発明の範囲内である。このようなgalectin-2の転写活性を阻害又は促進する物質は、心筋梗塞治療剤、抗炎症剤、免疫抑制剤などの各種薬剤の候補物質として有用である。

#### [7] galectin-2 の転写制御因子のスクリーニング方法

本発明においてはまた、前記した一塩基多型を含む遺伝子断片と galectin-2 の転写制御因子の存在が予想される試料を接触させ、上記断片と転写制御因子との結合を検出することによって、galectin-2 の転写制御因子をスクリーニングすることもできる。前記の一塩基多型を含む遺伝子断片と galectin-2 の転写制御因子の存在が予想される物質との結合の検出は、ゲルシフト法（電気泳動移動度シフト解析：electrophoretic mobility shift assay, EMSA）、DNase I フットプリント法等によって行うことができるが、ゲルシフト法が好ましい。ゲルシフト法では、タンパク質（転写制御因子）が結合すると、分子サイズが大きくなり電気泳動におけるDNAの移動度が低下するので、 $^{32}\text{P}$ で標識した遺伝子断片と転写制御因子を混ぜ、ゲル電気泳動にかける。オートラジオグラフィーでDNAの位置を見ると、因子の結合したDNAはゆっくり動くので、通常バンドよりも遅れて移動するバンドとして検出される。

以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されるものではない。

### 実施例

#### (A) 方法・材料

## (1) E. coli two hybrid system

BacterioMach™ Two Hybrid System construction kit (Stratagene 社製)を用いて行った。ライブラリー作製のための培養ヒト冠状動脈血管平滑筋細胞(HCASMC)は、BioWhittaker 社より購入した。1 × 10<sup>7</sup> 個の細胞より FastTrack 2.0 kit(invitrogen 社)を用いてmRNAを調製し、5 μg の HCASMC mRNAを用い、添付プロトコールに従ってcDNAライブラリーを作製し、添付プロトコールに従ってTwo-hybridスクリーニングを施行した。

## (2) リコンビナント galectin-1、-2、-3 及びLTAの作製、免疫沈降によるLTAと galectin の結合確認

galectin-1、-2、-3 は、全長を pET 28 vector system (Novagen 社)で組み換え体を作製し、添付プロトコールに従って大腸菌で発現、精製した。また、LTAは pET29 system (Novagen 社)により作製した。抗LTA抗体(R&D system 社)は HiTrap NHS-activated HP sepharose (Amersham 社) に添付プロトコールに従って架橋した(抗LTA抗体セファロース)。LTA-galectin の結合実験は、10ml binding buffer[10mM Tris/HCl (pH7.5), 150mM NaCl] 中に5 μg の galectin-1 あるいは galectin-2 あるいは galectin-3 を加え、さらに1時間攪拌した。1600回転で10分間遠心し、上清を捨て、沈殿を wash buffer[10mM Tris/HCl (pH7.5), 150mM NaCl, 0.1% NP-40]で3回洗浄し、50 μl の 5 × SDS-sample buffer(125mM Tris/HCl, 4% SDS, 20% glycerol, 10% beta-mercaptoethanol, 0.04% bromophenol blue, pH6.8)で溶解しサンプルとした。

SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動後、ニトロセルロース膜に移し、抗T7抗体(Novagen 社)を用いて、ECL法(Amersham 社)によりシグナルを検出した。COS7細胞(Riken cell bank)を用いた強制発現系によるLTAと galectin-2 の相互作用(結合)の確認では、pFLAG-CMV-5a vector(コスモバイオ社)にLTAを、pCMV-Myc vector (Clontech 社)に galectin-2 を組み換え体として導入し、COS7細胞にFuGene reagent(ロッシュ社)を用いてトランスフェクションした。36時間後の細胞を回収、細胞タンパク抽出バッファ[10mM Tris/HCl, 150mM NaCl, 0.5% NP-40]によりタンパクを抽出した後、非特異的吸着を抑制するために、この抽出液

に 50  $\mu$ l の protein A sepharose (Amersham 社) を加え 1 時間攪拌し、1 6 0 0 回転で 1 0 分間遠心し、上清を免疫沈降のサンプルとした。サンプルに 5  $\mu$ g の抗 LTA 抗体を加え 1 7  $^{\circ}$ C で 1 時間攪拌後、protein A sepharose 5 0  $\mu$ l を加え 1 7  $^{\circ}$ C で 1 時間攪拌し、1 6 0 0 回転で 1 0 分間遠心し、沈殿を wash buffer [10mM Tris/HCl (pH7.5), 150mM NaCl, 0.1% NP-40] で 3 回洗浄してサンプルとした。SDS-PAGE 後、ニトロセルロース膜に移し、抗 Myc-tag 抗体 (SANTA CRUZ 社)、抗 FLAG-tag 抗体 (SIGMA 社) によりシグナルを検出した。

### (3) galectin-2 遺伝子内 SNPs と心筋梗塞との相関解析

心筋梗塞患者とコントロール群、その DNA の採取方法、DNA のシーケンス法、DNA タイピング法、相関解析の統計学的手法は既報に従っている (Ozaki K et al. Nature Genetics 32, 650-654, 2002)。galectin-1 および galectin-2 遺伝子領域の SNPs は、それぞれ 1 6 人の心筋梗塞およびコントロールからの DNA を用いた PCR ダイレクトシーケンス法により同定・発見した。

### (4) ルシフェラーゼアッセイ法

galectin-2 遺伝子の 3 1 8 8 から 3 4 0 4 までの intron 1 3 2 7 9 C あるいは T の SNP を含む領域をゲノム DNA を鋳型として PCR により増幅し galectin-2 promoter-pGL3-enhancer ベクターのルシフェラーゼの下流にクローニングした。これらのプラスミド 2  $\mu$ g 及び 1 0 0 mg の pRL-TK ベクター (promega 社; トランスフェクション効率を合わせるための内部標準ベクター) を HeLa 細胞 (ヒューマンサイエンス研究資源バンク、JCRB 9 0 0 4) および Hep G 2 細胞に FuGene reagent を用いてトランスフェクションした。2 4 時間後細胞を集め、ルシフェラーゼ活性を測定した。

### (5) タンデムアフィニティー精製

タンデムアフィニティー精製は、Rigaut, G et al. Nature Biotechnol, 17, 1030-1032 (1999) に記載の方法に準じて行った。His tag、TEV 切断部位、及び S tag を TAPtag 配列としてコードする融合カセットを pCMV-Myc ベクター (シグマ社) 中に構築した。この TAP ベクターは、サイトメガロウイルスプロモーターの制御下で哺乳動物細胞中に、カルボキシ末端に TAP タグを有しアミノ末端に Myc

タグのついた標的タンパク質を発現する。TAP ベクターをHeLa細胞（ヒューマンサイエンス研究資源バンク、JCRB9004）に一過性にトランスフェクションした。標的タンパク質のバンドをAPRO Life ScienceのMALDI/TOF mass スペクトル測定装置により分析した。

#### （６）共免疫沈降実験

内因性 $\alpha$ -チューブリンとFlagのタグのついたgalectin-2又はLTAを用いて共免疫沈降実験を以下の通り行った。Flag又はSのタグのついたLTA、galectin-2、そしてlacZ（陰性対照）をHeLa細胞にFugeneを用いてトランスフェクションした。免疫沈降は、溶解緩衝液（20mM Tris pH7.5, 150mM NaCl, 0.1% Nonident P-40）中で行った。トランスフェクションの24時間後、細胞を溶解し、免疫沈降を抗-Flag tag M2 アガロース（シグマ社）を用いて行った。HRP 結合 S-プロテイン（Novagen）、抗-Flag M2 ペルオキシダーゼ結合体（Sigma）又はヒト $\alpha$ -チューブリンに対するマウスモノクローナル抗体（Molecular Probes）、及びHRP 結合抗マウスIgG抗体を用いて、免疫複合体を可視化した。

#### （７）共焦点顕微鏡分析

ポリクローナル抗ヒトgalectin-2抗血清を、大腸菌で合成した組み換えタンパク質を用いてウサギで作成した。この抗血清は、ウエスタンブロット分析によれば、構造が類似しているgalectin-1及びgalectin-3との交差反応性を示さなかった。ポリクローナル抗galectin-2抗血清、及びヤギ抗ヒトLTA IgG（R&D System）又はマウス抗ヒト $\alpha$ -チューブリンモノクローナルIgM抗体を、Alexa 二次抗体（Molecular Probes）と一緒に使用した。U937細胞（ヒューマンサイエンス研究資源バンク、JCRB9021）を、ホルボールミリステートアセテート（PMA）（20 ng/ml）で30分間刺激し、固定した。その後、3%ウシ血清アルブミンを含むリン酸緩衝生理食塩水中で対応する一次抗体、そして対応するAlexa 二次抗体と一緒にインキュベートした。

#### （８）免疫組織化学分析

組織試料は、16名の心筋梗塞患者から方向性冠状動脈粥腫切除術により取得した。免疫組織化学分析は、ヤギ抗ヒトLTA IgG（R&D Systems）及びウサギポリクロ



ーナル抗ヒト galectin-2 抗体を用いて既報 (Minami, M et al. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 21, 1796-1800 (2001); 及び Shi, S.R., et al., Hum. Mutat. 15, 7-12 (2000)) の通り行った。隣接する切片の染色は、SMC-2 アクチン及び CD68 に対するヒト細胞型特異的モノクローナル抗体 (DAKO) を用いて行った。二重標識した免疫組織化学分析としては、切片を先ず抗 LTA 抗体とインキュベートし、それからビオチン化ブタ抗ヤギ IgG、そしてアビジン・ビオチン・ペルオキシダーゼ複合体とインキュベートし、3, 3'-ジアミノベンジジンテトラヒドロクロライド (Vector Labs) で可視化した。続いて切片をウサギポリクローナル抗ヒト galectin-2 抗体とインキュベートし、そしてアルカリホスファターゼ結合ブタ抗ウサギ IgG とインキュベートし、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドキシルホスフェートおよびニトロブルーテトラゾリウムクロライド (BCIP/NBT) 基質系で可視化した。

## (B) 結果

### (1) 心筋梗塞感受性遺伝子産物 LTA に結合するタンパク質の同定 (スクリーニング)

LTA に結合する新規タンパクをスクリーニングするために E.coli two hybrid-system を利用し血管平滑筋細胞由来 two hybrid-library より、LTA の結合候補タンパク質として galectin-1 を同定した。

### (2) LTA と galectin-1, 2 のインビトロでの結合の確認

リコンビナント galectin-1 (T7 tag を N 末端側に結合) 及び LTA をそれぞれ個別に大腸菌で発現、精製後、抗 LTA 抗体架橋セファロースとこれらを反応し、洗浄後、SDS-PAGE を行い、抗 T7 抗体を用いたウエスタンブロット法により galectin-1 を検出した (図 1 a)。

図 1 a において、レーン 1 では、galectin-1 を抗 LTA 抗体セファロースを用いて免疫沈降した (陰性コントロール)。レーン 2 では、galectin-1 と LTA とをインキュベートし、複合体を抗 LTA 抗体セファロースを用いて免疫沈降した。レーン 3 では、100 ng の組換え galectin-1 を陽性コントロールとして用いた。星印は、抗 LTA 抗体セファロース中のイムノグロブリン (Ig) 重鎖及び軽鎖に

由来する非特異的バンドを示す。

また、galectin-1 と高いホモロジーを有する galectin-2 および-3 についても大腸菌よりリコンビナントプロテインを作製して、同様の手法により L T A との結合を確認したところ、galectin-2 も L T A と結合することが明らかとなった (図 1 b)。

図 1 b では、L T A と共沈降した Galectin を、抗 T 7 t a g モノクローナル抗体と西洋ワサビペルオキシダーゼ結合抗マウス I g G を用いたウエスタンブロット分析により検出した。レーン 1 では、galectin-3 と L T A とをインキュベートし、抗 L T A 抗体セファロースを用いて免疫沈降を行った。レーン 2 では、galectin-2 と L T A とをインキュベートし、複合体を抗 L T A 抗体セファロースを用いて免疫沈降した。レーン 3 では、galectin-2 を抗 L T A 抗体セファロースを用いて免疫沈降した (陰性コントロール)。レーン 4 及び 5 では、100 ng の galectin-3 (レーン 4) 又は galectin-2 (レーン 5) を陽性コントロールとして用いた。星印は、抗 L T A 抗体セファロース中のイムノグロブリン (I g) 重鎖及び軽鎖に由来する非特異的バンドを示す。

さらに、galectin-2 については、L T A T h r 2 6 及び L T A A s n 2 6 (Ozaki K et al. Nature Genetics 32, 650-654, 2002) との COS 7 細胞 (サル腎臓細胞株) への共強制発現系を用いた実験系により、その結合を培養細胞レベルでも確認した (図 1 c)。

図 1 C は、抗 L T A 抗体を用いた L T A と galectin-2 との共免疫沈降の結果を示す。COS 7 細胞に M y c タグ付き galectin-2 プラスミド又は F L A G タグ付き L T A プラスミド (T h r 2 6 または A s n 2 6) をトランスフェクションし、ライセートを調製し、プロテイン A セファロースと抗 L T A 抗体とを使用して免疫沈降に供した。L T A と共沈した Galectin-2 を、M y c (Galectin-2) 又は F L A G (L T A) - 抗モノクローナル抗体 - 西洋ワサビペルオキシダーゼ結合体を使用したウエスタンブロット分析により検出した。レーン 1 及び 2 では、L T A 2 6 T h r (レーン 1) 又は L T A 2 6 A s n (レーン 2) をトランスフェクションして沈降させた (L T A の陽性コントロール)。レーン 3 では、galectin-2

をトランスフェクションして沈降させた (galectin-2 の陽性コントロール)。レーン4及びレーン5では、galectin-2 と L T A 26 T h r (レーン4) 又は L T A 26 A s n (レーン5) をコトランスフェクションし、共沈降させた。

### (3) galectin-2 遺伝子内一塩基多型と心筋梗塞との相関

galectin-1 および-2 が L T A と結合することが明らかとなり、これらの遺伝子産物の機能変化が L T A の機能変化に結びつき、心筋梗塞の感受性に関連している可能性が示唆されることから、これら遺伝子内の一塩基多型 (S N P s) を新たに同定、発見し、その S N P s を用いて、患者、コントロールそれぞれ約 2300 例について case-control association study を施行した。その結果、galectin-2 遺伝子内 i n t r o n 1 3279 番目 C > T 新規 S N P の minor homozygote (T T allele) が心筋梗塞患者で有意に少ない ( $\chi^2 = 25.3$ ,  $P = 0.0000005$ ; o d d s r a t i o = 1.6) ことを見出した (表1) (塩基番号は変異命名による: Dunnen J. T 他、Hum. Mutation 15, 7-12, 2000)。このことから、galectin-2 i n t r o n 1 3279 の S N P が心筋梗塞にプロテクティブに働く因子と考えられ、galectin-2 の機能変化が心筋梗塞に関連している可能性が示唆された。

表 1 ; 心筋梗塞と Galectin-2 の SNP との相関

Genotype	MI	Control	$\chi^2$ [P value] (Odds ratio)<95%CI>			
			Genotype frequency	Allele frequency	CC vs Others	TT vs Others
Galectin-2 intron 1						
3279C>T*						
CC	1047(46.8%)	996(41.6%)	29.6	25.5	12.8	25.3
CT	987(44.2%)	1069(44.7%)	[0.00000038]	[0.00000044]	[0.00034]	[0.00000050]
TT	202(9.0%)	329(13.7%)	(1.71)	(1.24)	(1.60)	(1.60)
Total	2236(100%)	2394(100%)	<1.41-2.08> <1.10-1.39> <1.33-1.93>			

今回新たに同定した galectin-2 遺伝子の i n t r o n 1 の 3 2 7 9 番目 C > T の新規 S N P の周辺の塩基配列（配列番号 3 : 但し、配列番号 3 において Y は C 又は T を示す）を以下に示す。

5' -CCCCCCCAGCTCTAGGGACGACCACACCCACCCAGTTCTGCCTGTCTCTCTCTGCGCC  
TTTGACTCTGTTGGGTGGGGACAAGGCTCCCGGGCCTGCACCCTCCCGCAGCTCTCAGCA  
 TCCCTATTTGTCCAAGTGCACCCCTGACCCTGGACTTCCGAGTGCTTCTGCCCTGCAGCA  
 GCCCCACCTCTATCCTTGGGGTTTGAGCTTTGCTGTTTCAGTCAGGCAGCCCCCAGGAG  
 CTGCAAGGGGAGTGTGGGTGCTTCTCTTAGTCCAGGCCAGCTCCCCTATCCTGGCCTGA  
CTGTTGCAGGGCTCGGGGTGTGGGCACAGGCTGCTGGCAGGAGGCAGGGAGCCATCTCCT  
 GATGCTTGGTGTTAGA [C/T] GTGTGTGTGCGCAGGGCACACGTCTGTGAGTGTCTGTGT  
 GCGGGGCACACCTGTCTTCTGTTTCTTGTGTTGAGCCCCCTTTTGGACTGTCCTCACTGGAT  
 AACCTCATCTCCCAGAGATAATGGTCTTTGTTCAGTGAGAGACTGATTTTTTTTTTTTTTTT  
 TTTTTTTTTTGAGACGGAGTCT-3'

[C / T] は、i n t r o n 1 の 3 2 7 9 番目 C > T の S N P を示す。

下線を付した CTGCGCCTTTGACTCTGTT と TCTTTGTTCAGTGAGAGACTG は P C R p r i  
 m e r を示し、下線を付した CCTATCCTGGCCTGACTGTT はシーケンスプライマー  
 を示す。

(4) galectin-2 遺伝子 i n t r o n 1 3 2 7 9 の S N P の galectin-2 遺  
 伝子転写活性に与える影響

i n t r o n 1 3 2 7 9 の S N P の galectin-2 遺伝子転写活性に与える  
 影響を測定するために、レポーター遺伝子アッセイ（ルシフェラーゼアッセイ）  
 を施行した。galectin-2 遺伝子の i n t r o n 1 3 1 8 8 から 3 4 0 4 まで  
 のヌクレオチドよりなる DNA フラグメントを、p G L 3 - e n h a n c e r ベ  
 クターの S V 4 0 エンハンサーの下流に、5' から 3' の方向にクローニングし、  
 レポーターベクターを作製した。これらのレポーターベクターを H e L a 細胞お  
 よび H e p G 2 細胞にトランスフェクションし、24 時間後、Dual-Luciferase  
 Reporter Assay System (Promega 社) を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。

結果を図 2 (左図はH e L a 細胞、右図はH e p G 2 細胞での結果を示す) に示す。

#### (5) galectin-2 と微小管との相互作用

galectin-2 による LTA 分泌の制御機構を調べるために、タンデムアフィニティー精製(TAP)システムを用いて、galectin-2 と相互作用する細胞内分子を探索した。その結果、galectin-2-TAP タグを発現させた場合のみに検出できる 2 つの特異的なバンドを同定した (図 3 a)。MALDI/TOF mass スペクトル分析により、これらの 2 つのバンドは、微小管の重要成分である  $\alpha$ -及び  $\beta$ -チューブリンに対応することが示された。Flag のタグをつけた galectin-2 を発現するプラスミドでトランスフェクションした HeLa 細胞を用いて、内因性のチューブリン及び galectin-2 が一緒に免疫沈降することを確認した (図 3 b)。チューブリンは LTA と一緒に免疫沈降した (図 3 b)。二重免疫染色した U937 細胞の共焦点顕微鏡分析像から、galectin-2 及び  $\alpha$ -チューブリンは、細胞質に発達した網状フィラメントネットワークとして一緒に局在化していた (図 3 c)。この結果は galectin-2 が細胞内輸送に関与している可能性を示している。

#### (6) 冠状動脈粥腫切除術による試料における galectin-2 と LTA の発現と共局在

galectin-2 と LTA が、心筋梗塞の損傷 (即ち、冠状動脈のアテローム硬化性損傷) で発現しているかどうか、そして発現している場合にはその発現部位を調べるために、抗 LTA 又は抗 galectin-2 抗体を用いて、冠状動脈粥腫切除試料について免疫組織化学染色分析を行った。図 4 a 及び b に示す通り、LTA 及び galectin-2 についての免疫反応性が、アテローム斑の内膜細胞に検出され、そのうちの一部は紡錘体状、又は限定的に空胞化した丸い細胞質であった。隣接する切片を抗平滑筋細胞 (SMC)  $\alpha$ -アクチン又は抗 CD68 で免疫染色した結果、これらの細胞の大部分は平滑筋細胞であるか、平滑筋細胞由来の泡沫細胞であり、マクロファージも一部に見られた (図 4 c 及び d)。二重標識免疫組織化学分析により、LTA と galectin-2 の共発現が大部分の多形性の平滑筋細胞で見られた (図

4 e)。対照的に、細胞質が僅かな繊維斑の萎縮性平滑筋細胞や、正常な内側の平滑筋細胞では、何れのタンパク質の発現も検出されなかった（図 4 f）。これらの結果は、LTA と galectin-2 が、ヒトのアテローム硬化性斑の内膜の平滑筋細胞及びマクロファージでは共発現しているが、静止期又は正常な内側の平滑筋細胞では存在しないことを示している。

#### 産業上の利用可能性

本発明により、心筋梗塞等の炎症性疾患の発症進展に関与する新規な一塩基多型（SNP）が新たに同定された。本発明で同定された SNP を利用することにより、心筋梗塞等の炎症性疾患の診断法、又は炎症性疾患の治療薬の開発法を提供することが可能になる。

## 請求の範囲

1. galectin-2 遺伝子に存在する少なくとも一種の遺伝子多型を検出することを含む、炎症性疾患の判定方法。
2. galectin-2 遺伝子に存在する少なくとも一種の一塩基多型を検出することを含む、炎症性疾患の判定方法。
3. 配列番号 1 に示す galectin-2 遺伝子のイントロン 1 の塩基配列において 3 2 7 9 番目の塩基における C / T の多型を検出することを含む、炎症性疾患の判定方法。
4. 炎症性疾患が心筋梗塞である、請求項 1 から 3 の何れかに記載の方法。
5. 配列番号 1 に示す galectin-2 遺伝子のイントロン 1 の塩基配列において 3 2 7 9 番目の塩基を含む連続する少なくとも 10 塩基の配列、又はその相補配列にハイブリダイズすることができ、請求項 1 から 4 の何れかに記載の方法においてプローブとして用いるオリゴヌクレオチド。
6. 配列番号 1 に示す galectin-2 遺伝子のイントロン 1 の塩基配列において 3 2 7 9 番目の塩基を含む連続する少なくとも 10 塩基の配列、及び／又はその相補配列を増幅することができ、請求項 1 から 4 の何れかに記載の方法においてプライマーとして用いるオリゴヌクレオチド。
7. プライマーがフォワードプライマー及び／又はリバースプライマーである請求項 6 に記載のオリゴヌクレオチド。
8. 請求項 5 から 7 のいずれかに記載のオリゴヌクレチドの 1 種以上を含む、炎症性疾患診断用キット。
9. 炎症性疾患が心筋梗塞である請求項 8 に記載のキット。
10. 配列番号 1 に示す galectin-2 遺伝子のイントロン 1 の塩基配列において 3 2 7 9 番目の塩基における C / T の多型を検出することを含む、galectin-2 の発現状態の分析方法。
11. 候補物質の存在下で細胞内の galectin-2 遺伝子又は galectin-1 遺伝



子の発現量を分析し、その発現量を変化させる物質を選択する工程を含む、炎症性疾患の治療薬のスクリーニング方法。

1 2. 候補物質の存在下で細胞内の galectin-2 遺伝子又は galectin-1 遺伝子の発現量を分析し、その発現量を増大させる物質を選択する工程を含む、炎症性疾患の治療薬のスクリーニング方法。

1 3. 候補物質の存在下でリンホトキシン- $\alpha$  (LTA) と galectin-2 遺伝子産物又は galectin-1 遺伝子産物との結合を測定し、該結合を阻害する物質を選択する工程を含む、炎症性疾患の治療薬のスクリーニング方法。

1

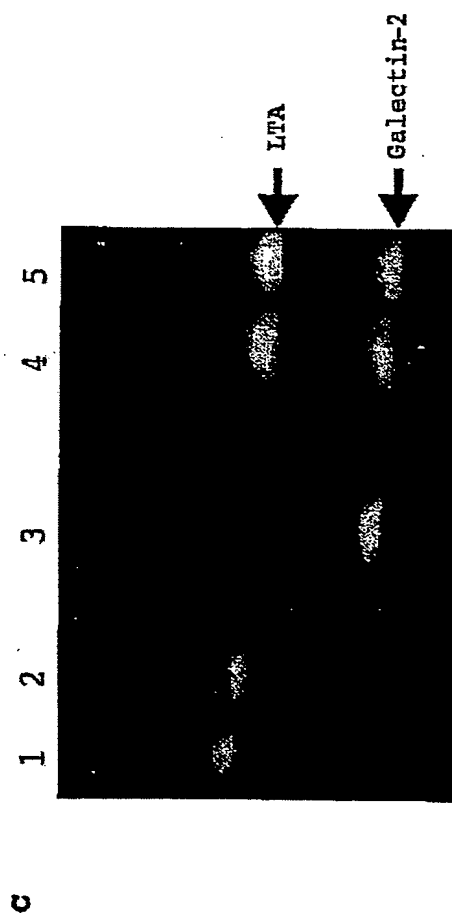
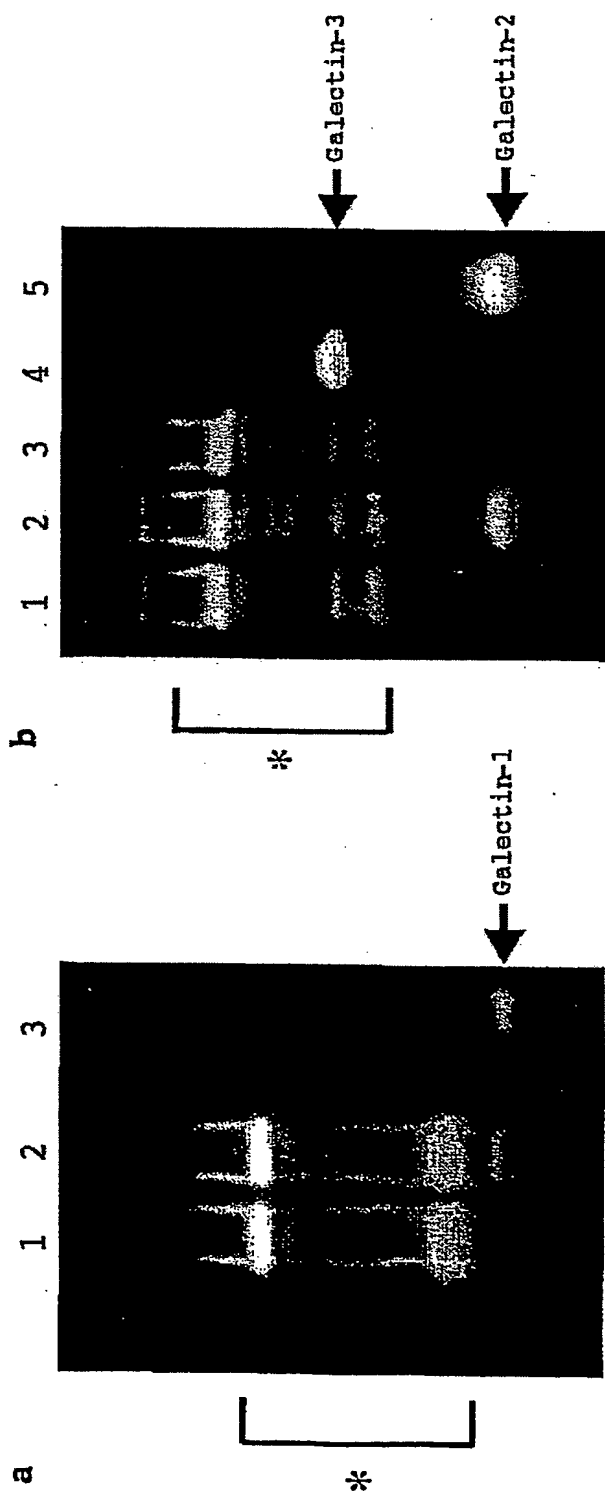


図 2

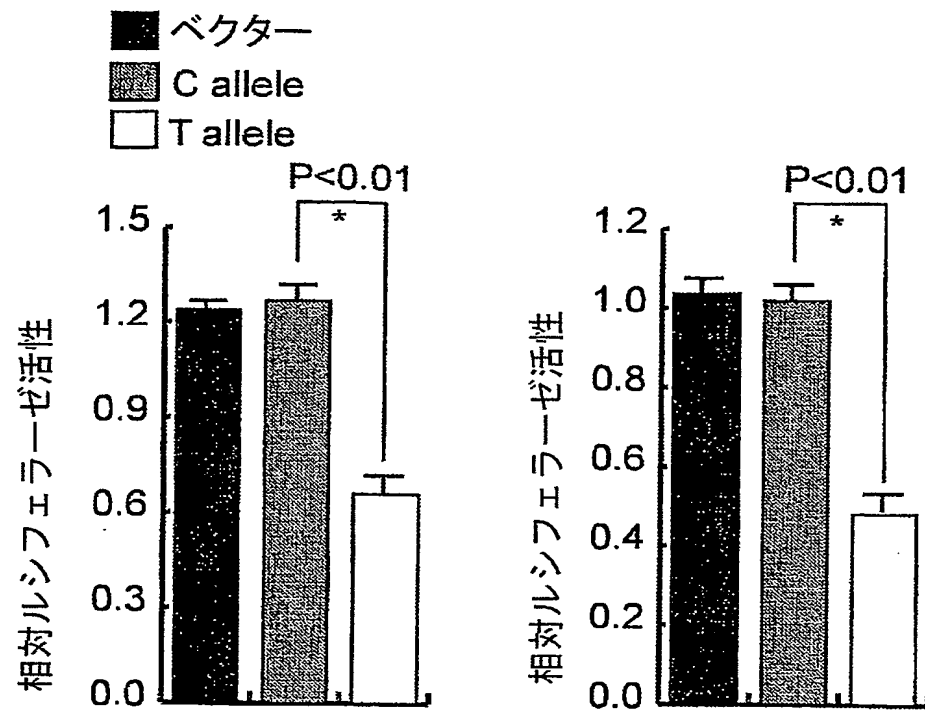


図 3

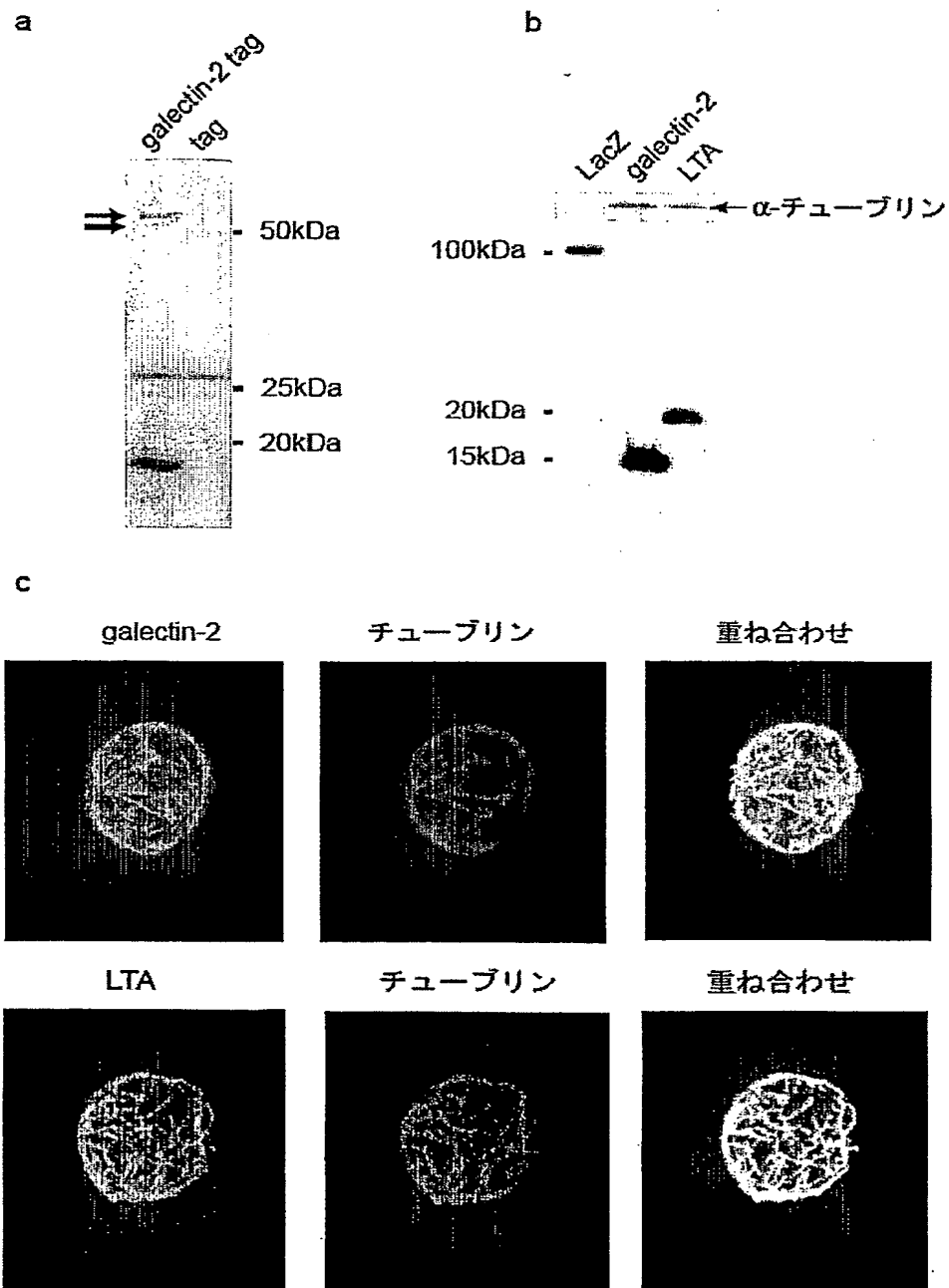
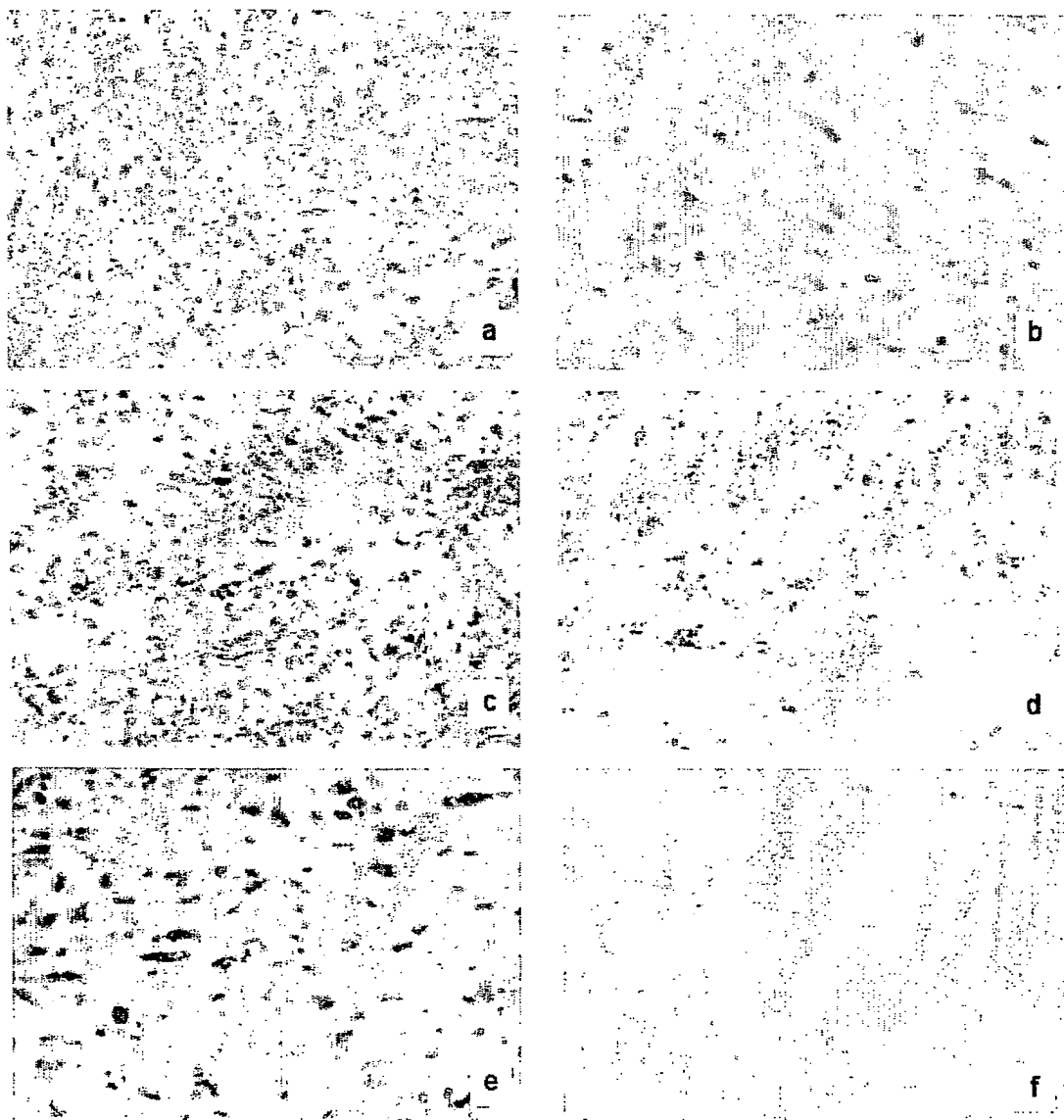


図 4



## SEQUENCE LISTING

1AP20 Rec'd PCT/JP 17 FEB 2006

&lt;110&gt; RIKEN et al.

&lt;120&gt; Method for judging inflammatory diseases using single nucleotide polymorphism within galectin-2 gene

&lt;130&gt; A41618A

&lt;160&gt; 3

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 7967

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 1

gtgaggacac tagccccctg ctgcctgccc cactctgttc atctttgtct ttgcctgggt 60  
gggggctttt agggaaaacc attgctgtcc ctctctgggc ctgagtttcc ccatctgtgc 120  
agcaaagaag ttggacagag gtcttttttt aaaaaacagc atcttgggcc aggcgtgggtg 180  
gctcctgctt gtaatccag cactttggga ggccgaggct ggtggatcat ctgaggttgg 240  
gagtttgaga ccagcctgac caacatggag aaaccccgtc tctactaaaa aaatacaaaa 300  
ttggctaggc ctggtggcac atgcctgtaa tcccagctaa tggggaggct gaggcaggag 360  
aatcacttgg acctgggagg cagaggttat ggtgagccga gattgtgcca ttgcactcca 420  
gcctgggcaa caagagttag actccatctc aaaacaacaa caacaatata gcatcttgct 480  
ctgtcaccag gtggagtga gtggtggcaa tcataactca ctacggactt gacctccttg 540  
gcttaaatga tcctcccacc tcagcctctt gagtagctgg gaccccaggc actcactacc 600  
acactggcta attttgttg tttcttttct ttctcttttt tttttttttt ttgagatgga 660  
gtctcgctct gttgccagg ctggagtga gtggcccgat ctgagctcac tgcaacctct 720  
gctgcctggg ttcaagcaat tctctggctc cagcctccca agtagctggg attacaggta 780  
tgtgtcacca cacctggcta attttttttt ttttggtgag atggagtttc tgttgcccag 840  
gctggagtgc aatggcagga tctcggtca ccacaacttc cacctcccag gttcaagcga 900  
ttctcctgcc tcagcctcct gagtagcagg gattacaggc atgggccacc acacccgatt 960

aattttgtat ttttagtaga gatggggttt ctccatgttg gtcaggctgg tcttgaactc 1020  
ctgatctcag gtgatccacc tgccttggcc tcccaaagtg ctgggattac aggtgtgagc 1080  
cactgctcct ggcctaattt ttgtattttt aaagtagaga cagggtttca ccatgttggt 1140  
caggctgac tcgaactcct gacctcaggt gatccgccca ccttggcctc ccaaagtgt 1200  
gggattacag gtgtgagcca cccacccag cttatttctt atttttcgta gagatgaggt 1260  
ctcactatgt tgctcaggct gatatcaaac tcctgggttc aagggtatcct cctgccttgg 1320  
cctctcgaag tgctgagatt acagggtgtga gccactgtgc ctggcctcca ttgatcttta 1380  
tagagataaa aaaaaatctc agcttgggca atatagttag accttttctg ctacaggtgc 1440  
atgccactac gctttgcctt aaaaaattag tgggggtagc ggcacactcc tcagccttgg 1500  
gaggtgagg atcacttgag cccaggaggt cgaggctaca gtgagccgta attgcactac 1560  
tgtactccag cctgggcaac agagttagac cttgtctcat ataccacac acaaaacca 1620  
agtcttgag agcaaattgc ccaaggccac aagctgcaa tcacaagggg ttgagtggat 1680  
tcccactgag gtctctgatt cgttgattct acaccagact ctgccacagc tttactgtgt 1740  
ggccttggcc aagtcactga cgtctctga gcccagctt tccttacatc tgtggaagg 1800  
gatcacaggc tgcctcttct gaggattaga tgggtgtatc attgcctagg gctgcaataa 1860  
caaattacca ccaaattgtg ggtggcttca cacgatagac gtttgttctg tcttggtttt 1920  
ggtgactaga aacctgaaac caaggtgcta cagggtacg ctctgtctga aggcgcaagg 1980  
ggagggttct ttcttgcctc ttccagcttc tgggtggctcc tcgcattcct tggcttgc 2040  
cactccaatc tctgcctcca acttcacgtg gactcctctg tgtgtctccg tctctgtgtc 2100  
tatatttctc tcctcttatg agaacactgg tcgtattgga tttaggacca accctaaacc 2160  
agtatgacct cttaactcga ttacatatgc aaaggaacta tttttaata ggtcacattg 2220  
aggctgggcg ggggtggctca cccctgtaat cccagcactt tgggaggccg aggcaggcgg 2280  
atcacttgag atcaggagtt caagaccagc ctggccaaca tggtgaaacc ctgtctgtac 2340  
tgaaaataca aaaacaaaaa agaagaagaa gaagaaaaaa aaattagaca gatgttgtgg 2400  
tgggcacccg taatcccagc tacttgggag gctgaggcag gagaatcggt tgaacccggg 2460  
aggcagaggt tgcagtgagc cgagatcgag ccactgtact ccagcctagg tgacagagtg 2520  
agacttcac tcaaaaaaaa aaaaaaaggc cacattgaca gggtccaggt ggacatgaat 2580

tttcggggga cgctattcaa gtgcaggggg gatgcaggat gtgaatgtgc caggggtcct 2640  
gcgtggaagg gtctatgcc tcatcacct ctgcctctcg gggaggactg ctgtggccca 2700  
eggactctcc ccaccttctc ttctctggtc atctcacctc tgccttttct ttcctctctc 2760  
tccagctcca gaggccatat catccaaatc ccttatacga cagataaggg aaccaaggcc 2820  
cagaaagggg ctaagctggc ccagggcccc tctgccaat aggggcagag tcggcactag 2880  
agtctggggc cccaactccc cccccccca gctctaggga cgaccacacc cccaccagt 2940  
tctgcctgtc tctctctgog cctttgactc tgttgggtgg ggacaaggct cccgggcctg 3000  
caccctcccg cagctctcag catccctatt tgtccaagt caccctgac cctggacttc 3060  
cgagtgttc tgccctgcag cagccccac ctctatcctt ggggtttgag ctttgctgtt 3120  
tcagtcaggc agccccagg agctgcaagg ggagtgtgg tgcttctctt agtccaggcc 3180  
cagctccct atcctggcct gactgttgca gggctcgggg tgtgggcaca ggctgctggc 3240  
aggaggcagg gagccatctc ctgatgcttg gtgttagacg tgtgtgtgcg cagggcacac 3300  
gtctgtgagt gtctgtgtgg cgggcacacc tgtcttctgt ttcttgttt agcccccttt 3360  
ggactgtcct cactggataa cctcatctcc cagagataat ggtctttgtc agtgagagac 3420  
tgatTTTTTT TTTTTTTTT TTTTTTTga gacggagtct cgctctgtcg ccaggctgg 3480  
agtgcagtgg cgccatcttg gctcactgca agcaccgcct cccgggttca cgccattctc 3540  
ctgcctcagc ctcccgagta gctgggacta caggcgctg ccaccacgcc cggctaattt 3600  
tttgatTTTT tagtagagac agggtttcac cgtgttagcc aggatgatct cactctcctg 3660  
acctcgtgat ccgccccct cggcctccca aagtgtggg attacagggtg tgagccaccg 3720  
cccctggcca gcaagagact gattttaatc ccgtctgtct ggctccaaaa tctggacca 3780  
accccgttgt gttaagcaaa gacatgggga gtaggtgtc cagcctcaa accccacttt 3840  
ctctaaagca gggaggTTTT gctcccagga gacaacggac cctgtctgga gacattcttg 3900  
gttgtcaccc ctcaggggag ggtgtcactg acatccagt ggtagaggcc aggaatactg 3960  
ctcaacatcc tacaacacaa gagacagacc ccaacaaaga aatgcctgcc ccaaacgtcc 4020  
agacggccaa ggctgagaag ctctggtctg agcagcctcc tgtctgacat gccgccgtca 4080  
tgccccgtg tcttggtta agcattgtg cctctccag gcgtctctta taaaatgtac 4140  
tgccaggccg ggcacagtgg cttacacctg taatcccaac actttgggag gccgagggtg 4200



gaggatcctt tgagctcagg aggtcgaggc tggcctggac aacatagtga gaccccatct 4260  
gaaaaaaaaa aaaatcagct gggccagggt ggatgcctgt ggtccaggct acctgggggg 4320  
ctgagggtggg aggattgctt gagcccaaga ggtcaaggct gtagtgagct ctgatcatat 4380  
cactgcactc tagcctgggt gacagagcaa gacctttaaa aaaaaatgta ttaccggctg 4440  
aggcaggagg accacttgag ggtcaggagt tccagagcag cctgggtaac atagcaaac 4500  
cctatctcta caaaaatttt aaaaattagc tgggcatggt ggcacacgtc tatagtcgta 4560  
gctacttagg aggctgagge aggagaatcg tttgagctca ggaggctatg aggctgcatg 4620  
cagtgagtta taatcgtgct actgcactcc atcttgggtg acagagcaag accctgtctc 4680  
aaaaaaaaaa aaaaaagaaa gaaaagaaaa aaaatgctgg gtgtggtatc tcaccctat 4740  
aatcccagaa ctttgggagg ccagagggg aggatcactt gaggtcagga gttcgagacc 4800  
aacctggcca aagtgggtgaa acccgtctc tactaaaaat acaaagaaaa ttagctagat 4860  
atggtggtgg gagcctgtaa tctcagtac tcgggaggct gaggcaggat aattgcttga 4920  
atctgggaag tggaggttgc agtgagccaa gattgcacca ctgcactcca gcatgggtga 4980  
cagagtgaga ctccatctca acatctcaaa aaaaaaaaaa aaagaactta ctgcctgtgg 5040  
aagagttgag caatacctaa caacctacc ctacatgtga ccaaccagcg ggctacttcc 5100  
tcctctgcag agaggaggcg gctgccagcg agagggcact gaggtctc ccatggccac 5160  
tgcccccttg acttctggca aagtgcccc gtccaatgag ctcatcagg gcatctcaga 5220  
tcatgctttt tctggaaata aaaagtcagt gagcagaact ccacaaatgt aaaagtgtcc 5280  
tcccataagt tgttctaaat ctttgggtgcc tgttgcgtcc tggtcagacc aaccctcacc 5340  
ctctgggtcat agatgcgaaa actgggtctg ggtaatgagt tttttttttt tttttttttt 5400  
agacagagtc ttgctctgtc gcctggcaca atctcggctc actgcaacct ccacctcctg 5460  
ggttcaagcg attctcttgc ctacgcctcc caagtagctg ggacgacagg catgtgccac 5520  
cacaccggc taatttttgt atttttaata gagacagggt ttctccatgt tggccaggcc 5580  
agtctcaaac tcctgacctc aggtgatcca ccgactcag cctcccaaag tgctgggatt 5640  
acaggcgtga gccaccgctc ccagccctgg gtaatgagct ttgaaaacc agcttagaaa 5700  
tcttccctag taaccatcgt gaggctagag gaggtccta ctgtacagaa attcagggtc 5760  
tgctttccta tggaataa ggagcagatg aatcttaaca acaagtaatc aaaatgatgg 5820

tcatttgggc agaccactgt ccagaaaaaa agaaaaaatt taaaaaagaa aattaaggct 5880  
gggcttggtt cacgcctgta atcccagcac tttggggagc tgaggtaggc agatcaattg 5940  
aggccaggag tttgagacca gccacaccaa catggtgaaa ccttgtctct actaaaaatg 6000  
caaaaaattag gcatggtggt acatgcctgt agtcccagct actcgggagg ctgaggcagg 6060  
agaatcgctt gaacctgaga ggtggagggt gcagtgagtc gagatcgcac cgttgcactc 6120  
cagcctgggc gacaaagcaa gactctgtct aaaaaaacia aaaaaaaaac aaaaaaagaa 6180  
aaggaaagta aaacaataaa tgatggtggt cctgtgattt gctgttggtc tacgtgaggc 6240  
cctgtgcatg ggatttcaca aacatgttct tgaatcctct caaaaccagc ttgaagggtg 6300  
gtggtgtctc cctgggtgtga cagggtctgt catacagctg gcattcagca acaacaacia 6360  
caaaaataga aatgggagtc tcgctatggt gccaggctg gtctccaact cctgggctca 6420  
agtgaccctc ctgtctcagc atcctgagta gctggaatac aggtacacac ttccacaccc 6480  
aggctatcaa ctgtttttta aatgaataaa tcaaattagt caattttaca gaaggggaaa 6540  
gtgaggcttg gagagagact ttgatggaca taggacttgc ggagttttat agattcttag 6600  
tttttgttcg tttgtttgtt tttgtttttg agacagagtc ttgctctgtt gcctaggctg 6660  
gagtgcagtg gcgtgatctt gtcttactgc aacctctgcc tcccaggctt aagccgttct 6720  
cctgcctcag cctcccaagt agctgggact atagatgcgt gccaccacac ctggctaatt 6780  
tttgcathtt tagtagagac agggttaaat gtaggcaga ctggtcttaa actcctgacc 6840  
tcaggatgat tggtgcctc ggccttccaa agtgctggga ttacagggtg gagccactgt 6900  
gcccggcctt ttttttttgt ttttctttga gatgaaaagt cactcttgct gccaggctg 6960  
gagtgaatg gtacgatctc agctcatggc aacctccgct tccagaattc aagcaattct 7020  
cccgcctcag cctcccaagt agctgggatt acaggcgccc gccaccatgc gcagataatt 7080  
tattttatht tattttatht attattatta ttattattat tattattatt tttgagatgg 7140  
agtttcgctc tgtcgcccag gctggagggc agtgacgca tctcacctca ctgcaagctc 7200  
cgctcccgg gttcacacca ttctctgcc tcagcctccc gagtagctgg gactacaggc 7260  
acctgccacc acaccggct aactttttgt atttttagta gagatggggt ttaccatgt 7320  
tagccaggat ggtctcgatc tctgacctc gtgatccgcc cgcctcgcc tccaaaaagt 7380  
gttgggatta cagggtgtgag ccaccgcgtc cggccaattt ttttattttt agtagagacg 7440

aggtttcacc atgttgccca ggctgggtgc taactcctga cctcaggtga tcagcccgcc 7500  
tcggcctccc aaaatgctgg gattacaggc gtgagccccct gcacctggcc agatttagtt 7560  
ttgggtgggc caagatcttg tgcctctgat acagtcattt tccatatcat atttttgttt 7620  
ctggggttct gctgagggca gcgtgatttc atcacttgaa cactttgcgg aactgggcag 7680  
gaagcactct gccatttca tagatgggca aactgagcct ccgtcctgtg cctcttcggg 7740  
ttgggggtgga taagagcaaa acagggcagg gagtggggaa gctctgggag gccttgatca 7800  
gagcgtcttg gctctgccac tttccagctt ggtgggtctcc tgcgtcctca cgtgggcagg 7860  
gggattgaga cctgcagctg ggttggcatg aggtggatga agctgctggg caagtgtggg 7920  
attgattttc tgtggggact cgagtggaat gtttctctgt tggccca 7967

<210> 2

<211> 9821

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

gggagatgca ggcggggaga cacaaggtag aaggggcaaa gtcctcacct aggaccttga 60  
gggagttaat gtgtaatatt ctaggatata agcttgacca cgagttgaga ccctgagcac 120  
aggcctccag gagccgctgg gagctgccgc caggagctgt caccatgacg gtgaggacac 180  
tagccccctg ctgcctgccc cactctgttc atctttgtct ttgcctgggt gggggccttt 240  
agggaaaacc attgctgtcc ctctctgggc ctgagtttcc ccatctgtgc agcaaagaag 300  
ttggacagag gtcttttttt aaaaaacagc atcttgggcc aggctgggtg gctcctgctt 360  
gtaatcccag cactttggga ggccgaggct ggtggatcat ctgaggttgg gagtttgaga 420  
ccagcctgac caacatggag aaaccccgtc tctactaaaa aaatacaaaa ttggctaggc 480  
ctgggtggcac atgcctgtaa tcccagctaa tggggaggct gaggcaggag aatcacttgg 540  
acctggggagg cagaggttat ggtgagccga gattgtgcca ttgcactcca gcctgggcaa 600  
caagagtgag actccatctc aaaacaacaa caacaataca gcatcttgct ctgtcaccag 660  
gtggagtgca gtgggtggcaa tcataactca ctacggactt gacctccttg gcttaaataga 720  
tcctcccacc tcagcctctt gagtagctgg gaccccaggc actcactacc aacttggtta 780

atTTtGtttg tttcttttct ttctcttttt tttttttttt ttgagatgga gtctcgtctct 840  
gttgcccagg ctggagtgca gtggcccgat ctCagctcac tgcaacctct gctgcctggg 900  
ttcaagcaat tctctgggtct cagcctccca agtagctggg attacaggta tgtgtcacca 960  
cacctggcta atTTTTTTTT ttttgttgag atggagtttc tgttgcccag gctggagtgC 1020  
aatggcacga tctcggctca ccacaacttc cacctcccag gttcaagcga ttctcctgcc 1080  
tcagcctcct gagtagcagg gattacaggc atgggccacc acacccgatt aatTTtGtat 1140  
ttttagtaga gatgggggttt ctccatgttg gtcaggctgg tcttgaactc ctgatctcag 1200  
gtgatccacc tgccttgGCC tcccaaagtG ctgggattac aggtgtgagc cactgtctct 1260  
ggcctaattt ttgtattttt aaagtagaga cagggtttca ccatgttggt caggctgatc 1320  
tcgaactcct gacctcaggt gatccgcca ccttgccctc ccaaagtgtt gggattacag 1380  
gtgtgagcca cccacccag cttatttctt atttttcgta gagatgaggt ctCactatgt 1440  
tgctcaggct gatatcaaac tcctgggttc aagggtatcct cctgccttgg cctctcgaag 1500  
tgctgagatt acaggtgtga gccactgtgc ctggccctca ttgatcttta tagagataaa 1560  
aaaaaatctc agcttgggca atatagtGag accttttctg ctacagggtgc atgccactac 1620  
gctttgcctt aaaaaattag tgggggtagc ggcacactcc tcagccttgg gaggtgagg 1680  
atcacttgag cccaggaggt cgaggctaca gtgagccgta attgcactac tgtactccag 1740  
cctgggcaac agagtGagac cttgtctcat ataccacac acaaaacca agtcttggag 1800  
agcaaattgc ccaaggccac aagctgcaaa tcacaagggg ttgagtggat tccactgag 1860  
gtctctgatt cgttgattct acaccagact ctgccacagc tttactgtgt ggccttgGCC 1920  
aagtcactga ccgtctctga gccccagtct tccttacatc tgtggaaggG gatcacaggc 1980  
tgCctcttct gaggattaga tgggtgtatc attgcctagg gctgcaataa caaattacca 2040  
ccaaattgtg ggtggcttca cacgatagac gtttgttctg tcttggtttt ggtgactaga 2100  
aacctgaaac caaggtgcta cagggtacg ctCctgctga aggcgcaagg ggagggttct 2160  
ttcttgccctc ttccagcttc tgggtggctcc tcgcattcct tggcttgcat cactccaatc 2220  
tctgcctcca acttcacgtg gactcctctg tgtgtctccg tctctgtgtc tatatttctc 2280  
tcctcttatg agaacactgg tcgtattgga tttaggacca accctaaacc agtatgacct 2340  
cttaactcga ttacatatgc aaaggaacta tttttaaata ggtcacattg aggctgggGg 2400

gggtggetca cccctgtaat ccagcactt tgggaggcgg aggcaggcgg atcacttgag 2460  
atcaggagtt caagaccagc ctggccaaca tggtgaaacc ctgtctgtac tgaaaataca 2520  
aaaacaaaaa agaagaagaa gaagaaaaaa aaattagaca gatgttgttg tgggcacccg 2580  
taatcccagc tacttgggag gctgaggcag gagaatcggg tgaaccggg aggcagaggt 2640  
tgcagtgagc cgagatcgag ccactgtact ccagcctagg tgacagagtg agacttcac 2700  
tcaaaaaaaaa aaaaaaaggt cacattgaca gggtccaggt ggacatgaat tttcggggga 2760  
cgctattcaa gtgcaggggg gatgcaggat gtgaatgtgc caggggtcct gcgtggaagg 2820  
gtctatgccc tcatcacct ctgcctctcg gggaggactg ctgtggccca cggactctcc 2880  
ccaccttctc tttctggtc atctcacctc tgccttttct ttcctctctc tccagctcca 2940  
gaggccatat catccaaatc cttatacga cagataaggg aaccaaggcc cagaaagggg 3000  
ctaagctggc ccaggccccc tctgccaatt aggggcagag tgggcactag agtctgggcc 3060  
cccaactccc cccccccca gctctagga cgaccacacc cccaccagt tctgcctgtc 3120  
tctctctcg cctttgactc tgttgggttg ggacaaggct cccgggcctg caccctccc 3180  
cagctctcag catccctatt tgtccaagt caccctgac cctggacttc cgagtgttc 3240  
tgccctgcag cagccccac ctctatcctt ggggtttgag ctttgtgtt tcagtcaggc 3300  
agccccagg agctgcaagg ggagtgtgg tgcctctctt agtccaggcc cagctcccct 3360  
atcctggcct gactgttgca gggctcggg tgtgggcaca ggctgctggc aggaggcagg 3420  
gagccatctc ctgatgcttg gtgttagacg tgtgtgtgcg cagggcacac gtctgtgagt 3480  
gtctgtgttg cgggcacacc tgtctctgt ttcttgtttg agcccccttt ggactgtcct 3540  
cactggataa cctcatctcc cagagataat ggtctttgtc agtgagagac tgattttttt 3600  
tttttttttt ttttttttga gacggagtct cgctctgtcg ccaggctgg agtgcagtgg 3660  
cgccatcttg gctcactgca agcaccgcct cccgggttca cgccattctc ctgcctcagc 3720  
ctcccagata gctgggacta caggcgcctg ccaccacgcc cggctaattt tttgtatttt 3780  
tagtagagac agggtttcac cgtgttagcc aggatgatct cactctcctg acctcgtgat 3840  
ccgccccct cggcctccca aagtgtggg attacaggtg tgagccaccg cccctggcca 3900  
gcaagagact gattttaatc ccgtctgtct ggctccaaaa tctggacca accccgttgt 3960  
gttaagcaaa gacatgggga gttaggtgtc cagcctccaa accccacttt ctctaaagca 4020

gggagggtttt gctcccagga gacaacggac cctgtctgga gacattcttg gttgtcaccg 4080  
ctcagggggag ggtgtcactg acatccagtg ggtagaggcc aggaatactg ctcaacatcc 4140  
tacaacacaa gagacagacc ccaacaaaga aatgcctgcc ccaaacgtcc agacggccaa 4200  
ggctgagaag ctctggcttg agcagcctcc tgtctgacat gccgccgtca tggcccgtg 4260  
tcctgggtta agcattgctg cctcctccag gcgtctctta taaaatgtac tgccaggccg 4320  
ggcacagtgg cttacacctg taatcccaac actttgggag gccgagggtg gaggatcctt 4380  
tgagctcagg aggtcgaggc tggcctggac aacatagtga gaccccatct gaaaaaaaaa 4440  
aaaatcagct gggccagggt ggatgcctgt ggtccaggct acctgggggg ctgagggtggg 4500  
aggattgctt gagcccaaga ggtcaaggct gtagtgagct ctgatcatat cactgcactc 4560  
tagcctgggt gacagagcaa gacctttaa aaaaaatgta ttaccggctg aggcaggagg 4620  
accacttgag ggtcaggagt tccagagcag cctgggtaac atagcaaaac cctatctcta 4680  
caaaaatttt aaaaattagc tgggcatggt ggcacacgtc tatagtcgta gctacttagg 4740  
aggctgaggc aggagaatcg tttgagctca ggaggctatg aggctgcatg cagtgagtta 4800  
taatcgtgct actgcactcc atcttgggtg acagagcaag accctgtctc aaaaaaaaaa 4860  
aaaaaagaaa gaaaagaaaa aaaatgctgg gtgtggtatc tcaccctat aatcccagaa 4920  
ctttgggagg ccagagggg aggatcactt gaggtcagga gttcgagacc aacctggcca 4980  
aagtggtgaa accccgtctc tactaaaaat acaaagaaaa ttagctagat atggtggtgg 5040  
gagcctgtaa tctcagtac tcgggaggct gaggcaggat aattgcttga atctgggaag 5100  
tggaggttgc agtgagccaa gattgcacca ctgcactcca gcatgggtga cagagtgaga 5160  
ctccatctca acatctcaaa aaaaaaaaaa aaagaactta ctgcctgtgg aagagttgag 5220  
caatacctaa caacctaccc ctacatgtga ccaaccagcg ggtcacttcc tcctctgcag 5280  
agaggaggcg gctgccagcg agagggcact gaggtcctc ccatggccac tgcccccttg 5340  
acttctggca aagtgcccc a gtccaatgag ctcatcagg gcatctcaga tcatgctttt 5400  
tctggaaata aaaagtcagt gagcagaact ccacaatgt aaaagtgctc tcccataagt 5460  
tgttctaaat ctttgggtgc tgttgcgctc tggtcagacc aaccctcacc ctctgggtcat 5520  
agatgcgaaa actggctctg ggtaatgagt tttttttttt tttttttttt agacagagtc 5580  
ttgctctgtc gcctggcaca atctcggtc actgcaacct ccacctcctg ggttcaagcg 5640

attctcttgc ctcagcctcc caagtagctg ggacgacagg catgtgccac cacacccggc 5700  
taatttttgt atttttaata gagacagggt ttctccatgt tggccaggcc agtctcaaac 5760  
tcctgacctc aggtgatcca cccgactcag cctcccaaag tgctgggatt acaggcgtga 5820  
gccaccgctc ccagccctgg gtaatgagct ttgaaaacce agcttagaaa tcttccttag 5880  
taaccatcgt gaggctagag gaggctccta ctgtacagaa attcagggtg tgctttccta 5940  
tggaataata ggagcagatg aatcttaaca acaagtaate aaaatgatgg tcatttgggc 6000  
agaccactgt ccagaaaaaa agaaaaaatt taaaaaagaa aattaaggct gggcttggtt 6060  
cacgcctgta atcccagcac tttggggagc tgagggtgggc agatcaattg aggccaggag 6120  
tttgagacca gccacaccaa catggtgaaa ccttgtctct actaaaaatg caaaaattag 6180  
gcatgggtgt acatgcctgt agtcccagct actcgggagg ctgaggcagg agaatcgctt 6240  
gaacctgaga ggtggagggt gcagtgagtc gagatcgcac cgttgactc cagcctgggc 6300  
gacaaagcaa gactctgctc aaaaaaaca aaaaaaaaaac aaaaaaagaa aaggaaagta 6360  
aaacaataaa tgatgggtgt cctgtgattt gctgttggtc tacgtgaggc cctgtgcatg 6420  
ggatttcaca aacatgttct tgaatcctct caaaaccagc ttgaaggttg gtggtgtctc 6480  
cctgggtgtga cagggtctgt catacagctg gcattcagca acaacaaca caaaaataga 6540  
aatgggagtc tcgctatgtt gccaggctg gtctccaact cctgggctca agtgaccctc 6600  
ctgtctcagc atcctgagta gctggaatac aggtacacac ttccacaccc aggctatcaa 6660  
ctgtttttta aatgaataaa tcaaattagt caattttaca gaaggggaaa gtgaggcttg 6720  
gagagagact ttgatggaca taggacttgc ggagttttat agattcttag tttttgttcg 6780  
tttgtttggt tttgtttttg agacagagtc ttgctctgtt gcctaggctg gagtgcagtg 6840  
gcgtgatctt gtcttactgc aacctctgcc tcccaggctt aagccgttct cctgcctcag 6900  
cctcccaagt agctgggact atagatgcgt gccaccacac ctggctaatt tttgcatttt 6960  
tagtagagac agggttaaat gttaggcaga ctggtcttaa actcctgacc tcaggatgac 7020  
tggetgcctc ggccttccaa agtgctggga ttacagggtg gagccactgt gcccggcctt 7080  
tttttttgt ttttctttga gatgaaaagt cactcttgtc gccaggtg gagtgcaatg 7140  
gtacgatctc agctcatggc aacctccgct tccagaattc aagcaattct cccgcctcag 7200  
cctcccaagt agctgggatt acaggcgccc gccaccatgc gcagataatt tattttattt 7260

tattttattt attattatta ttattattat tattattatt tttgagatgg agtttcgctc 7320  
tgtgcccag gctggagggc agtgacgca tctcacctca ctgcaagctc cgcctcccgg 7380  
gttcacacca ttctcctgcc tcagcctccc gagtagctgg gactacaggc acctgccacc 7440  
acacccggct aactttttgt atttttagta gagatggggg ttcacatgt tagccaggat 7500  
ggtctcgatc tcttgacctc gtgatccgcc cgcctcggcc tcccaaaagt gttgggatta 7560  
cagggtgtgag ccaccgctc cggccaattt ttttattttt agtagagacg aggtttcacc 7620  
atgttgccca ggctgggttc taactcctga cctcaggtga tcagcccgcc tcggcctccc 7680  
aaaatgctgg gattacaggc gtgagcccct gcacctggcc agatttagtt ttgggtgggc 7740  
caagatcttg tgcctctgat acagtcattt tccatatcat atttttgttt ctgggggttct 7800  
gctgagggca gcgtgatttc atcacttgaa cactttgcgg aactgggcag gaagcactct 7860  
gccatttca tagatgggca aactgagcct ccgtcctgtg cctcttcggg ttgggggtgga 7920  
taagagcaaa acagggcagg gagtggggaa gctctgggag gccttgatca gagcgctctg 7980  
gctctgccac tttccagctt ggtggtctcc tgcgtcctca cgtgggcagg gggattgaga 8040  
cctgcagctg ggttggtcatg aggtggatga agctgctggg caagtgtggg attgattttc 8100  
tgtggggact cgagtggaat gtttctctgt tggcccaggg ggaacttgag gttaagaaca 8160  
tggacatgaa gccggggtca accctgaaga tcacaggcag catcgccgat ggcaactgatg 8220  
ggtgagcaag gtttcagggt tgggggagtc tgcaggcccg gaataggcag ggcgggtggg 8280  
gcaggcaggg cagccctgtg aagtgtcag gcaagaggga cgtcaggcca atgggccctt 8340  
tttcacaccc ttctccccac acccctgctg gccccactt catgtctgag gctaggtttg 8400  
gggacctgca gaatttcaga gttgatgcca tatgtcttat tcttttgccc caacagccat 8460  
tgaaggggca ggtggagaag cccctggaac tctgtctggc cccctgcggg gcaggtgcct 8520  
ctagggaacg cccaaatccc cagagacacc accctcttta ccagcagaa tggccacagg 8580  
ctggcatttc atgagcatta aaccagggca gccaccaggg gaggtgagt ggtctcgctg 8640  
gcctcctctt ggtagaacc agcggcctca ccacctccgt ggtcacagt ccagcgaaag 8700  
gctctctcgc ctgcagaaca tgtcagcga tcttggaact gtgctttatc tacttttggg 8760  
tagagagggg gcgggcagggt gcatgccata ggagctaagg gaaaagtgac ttatttctcc 8820  
tacttgggtc cctcaagttt gtcaaaatgt gtgataacct tggcttgaga ctcccaaatg 8880



aagacacccc atgaccaga atgcccact ttcaggaacc ctgcaggtct agcccaggct 8940  
cctgtagtga tcttgccaag aagtcataca accccggttg cacaccata gtgacaggga 9000  
gctcaccacc ttaggttggc tgctggtggc taaatttaaat aggtcttcag atatctaaga 9060  
gatagcattt ctctctccca ggagagccac cccaattcc cgaagctgtc actatcagtt 9120  
acccttctct caacagcgtg atccctgctc caaatggaat gtgctaccac agtgctaagt 9180  
ctgagcaggt tgttacctcc cttgttttaa ggcacagatc tcaactaaca caagctttga 9240  
ttcttccagc ttgtggtcaa ccaaggtcct ccaaccaag ctgctttatc caggcctgag 9300  
ccctgaacct cacctgctac cccttctcct gcagctttgt aattaatctg ggccagggga 9360  
cagacaagct gaacctgcat ttcaaccctc gcttcagcga atccaccatt gtctgcaact 9420  
cattggacgg cagcaactgg gggcaagaac aacgggaaga tcacctgtgc ttcagcccag 9480  
ggtcagaggt caaggtgagg tcaaaggggg aaagggcaact ggggtgatgt caaggggagg 9540  
gccagatgg aagagagcct ggccctggaca caggtgctgg ccttgtttga gccatcaggc 9600  
actgccctgg ccatttcca ggccctcctg cctccttgac accctccctc cccacagttc 9660  
acagtgcct ttgagagtga caaattcaag gtgaagctgc cagatgggca cgagctgact 9720  
tttcccaaca ggctgggtca cagccacctg agctacctga gcgtaagggg cgggttcaac 9780  
atgtcctctt tcaagttaa agaataaaag acttccagcc g 9821

<210> 3

<211> 558

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

ccccccagc tctagggacg accacacccc caccagttc tgctgtctc tctctgcgcc 60  
tttgactctg ttgggtgggg acaaggetcc cgggcctgca cctcccgca gctctcagca 120  
tccctatttg tccaagtga cccctgaccc tggacttccg agtgcttctg ccctgcagca 180  
gccccacct ctatccttgg ggtttgagct ttgctgtttc agtcaggcag ccccaggag 240  
ctgcaagggg agtgtgggtg cttctcttag tccaggccca gctcccctat cctggcctga 300  
ctgttgcagg gctcgggggtg tgggcacagg ctgctggcag gaggcaggga gccatctcct 360

gatgcttggt gttagaygtg tgtgtgcgca gggcacacgt ctgtgagtgt ctgtgtggcg 420  
ggcacacctg tcttctgttt cttgtttgag ccccttttgg actgtcctca ctggataacc 480  
tcatttccca gagataatgg tctttgtcag tgagagactg attttttttt tttttttttt 540  
ttttttgaga cggagtct 558